

## Other Formats:

## Links:

LOCUS E03345 1007 bp DNA PAT 26-NOV-1996  
 DEFINITION DNA sequence coding for unchangeable region of dog immunoglobulin gamma chain.  
 ACCESSION E03345  
 NID g2171562  
 KEYWORDS JP 1992040894-A/1.  
 SOURCE Canis sp..  
 ORGANISM Canis sp.  
 Eukaryotae; mitochondrial eukaryotes; Metazoa; Chordata;  
 Vertebrata; Mammalia; Eutheria; Carnivora; Fissipedia; Canidae;  
 Canis.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1007)  
 AUTHORS Kazuhiko,K., Yasuyuki,E., Hiroaki,M., Yoichi,O. and Yukio,T. .  
 TITLE GENE FRAGMENT TO CODE CONSTANT REGION OF DOG IMMUNOGLOBULIN CHAIN AND MOUSE X DOG CHIMERA ANTIBODY  
 JOURNAL Patent: JP 1992040894-A 1 12-FEB-1992;  
 CHEMO SERO THERAPEUT RES INST  
 COMMENT OS Canis sp. (dog)  
 PN JP 1992040894-A/1  
 PD 12-FEB-1992  
 PF 07-JUN-1990 JP 1990150673  
 PI KURUMI KAZUHIKO, EDA YASUYUKI, MAEDA HIROAKI, ONO YOICHI, PI  
 TOKIYOSHI YUKIO  
 PC C12N15/13,C07K13/00,C12N15/62,C12P21/08//A61K39/395,  
 G01N33/531, PC G01N33/577;  
 CC strandedness: Double;  
 CC topology: Linear;  
 CC hypothetical: No;  
 CC anti-sense: No;  
 CC \*source: tissue\_type=Liver;  
 FH Key Location/Qualifiers  
 FH  
 FT CDS 1..<1007  
 FT /product='Unchangeable region of dog FT  
 immunoglobulin gamma  
 chain'.  
 FT  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..1007  
 /organism="Canis sp."  
 /db\_xref="taxon:9616"  
 BASE COUNT 230 a 326 c 264 g 187 t  
 ORIGIN  
 1 cctccaccac ggccccctcg gttttccac tggaccccag ctgcgggtcc acttccggct  
 61 ccacggtggc cctggcctgc ctggtgtcag gctacttccc cgagcctgta actgtgtcct  
 121 ggaattccgg ctccctgacc agcgggtgtc acaccttccc gtccgacctg cagtcctcag  
 181 ggctctactc cctcagcagc atggtgacag tgccctccag cagggtgggtcc agcgagacct  
 241 tcacctgcaa cgtggccccc cgggccagca aaactaaagt agacaagcca gtgccccaaa  
 301 gagaaaatgg aagagttcct cgcccacctg attgtcccaa atgcccagcc cctgaaatgc  
 361 tgggagggcc ttcggtcttc atctttcccc cgaaacccaa ggacaccctc ttgattgccc  
 421 gaacacctga ggtcacatgt gtggtggtgg atctgggacc agaagaccct gaggtgcaga  
 481 tcagctgggt cgtggacggt aagcagatgc aaacagccaa gactcagcct cgtgaggagc  
 541 agttcaatgg cacctaccgt gtggtcagtg tccctcccat tgggcaccag gactgggtca  
 601 aggggaagca gttcacgtgc aaagtcaaca acaaagccct cccatccccg atcgagagga  
 661 ccatctccaa ggccagaggg caggcccatc agcccagtggt gtatgtcctg ccgcatccc  
 721 gggaggagtt gagcaagaac acagtcagct tgacatgcct gatcaaagac ttcttcccac  
 781 ctgacattga tgtggagtgg cagagcaatg gacagcagga gcctgagagc aagtaccgca  
 841 cgaccccgcc ccagctggac gaggacgggt cctacttctt gtacagcaag ctctctgtgg  
 901 acaagagccg ctggcagcgg ggagacacct tcatatgtgc ggtgatgcat gaagctctac

BEST COPY

COPY

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A) 平4-40894

⑫ Int.Cl.<sup>8</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)2月12日

C 12 N 15/13  
C 07 K 13/00

ZNA

7731-4H  
8717-4B

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全11頁)

⑭ 発明の名称 イヌ免疫グロブリンγ鎖の定常領域をコードする遺伝子断片および  
マウス×イヌキメラ抗体

⑮ 特 願 平2-150673

⑯ 出 願 平2(1990)6月7日

⑰ 発 明 者 来 海 和 彦 熊本県熊本市京町本丁4-60  
 ⑰ 発 明 者 江 田 康 幸 熊本県菊池郡合志町大字豊岡2012-88  
 ⑰ 発 明 者 前 田 浩 明 熊本県熊本市武蔵ヶ丘2丁目142 公団4-609  
 ⑰ 発 明 者 小 野 洋 一 熊本県熊本市清水町山室295-2 新規アパート101号  
 ⑰ 発 明 者 時 吉 幸 男 熊本県熊本市若葉3丁目14-19  
 ⑰ 出 願 人 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市清水町大窪668番地  
 ⑰ 代 理 人 弁理士 筒 井 知  
 最終頁に続く

明 示 部

## 1. 発明の名称

イヌ免疫グロブリンγ鎖の定常領域をコードする  
遺伝子断片およびマウス×イヌキメラ抗体

## 2. 特許請求の範囲

(1) イヌ免疫グロブリンγ鎖の定常領域ポリペ  
プチドをコードするDNA配列を有する遺伝子断片。

(2) 該定常領域ポリペプチドのC3ドメインのC末  
端側から最初のシステインの近傍のアミノ酸配列  
が下記のアミノ酸配列である前記第(1)項記載の遺  
伝子断片。

-Ile-Cys-Ala-

(3) 該定常領域ポリペプチドのC3ドメインのN末  
端側から3番目のアミノ酸から始まる配列が下記  
の配列である前記第(1)項記載の遺伝子断片。

-Ala-His-Gln-XXX-Ser-

(XXXは任意のアミノ酸)

(4) 該定常領域ポリペプチドのC3ドメインのN末  
端側から3番目のアミノ酸から始まる配列が下記  
の配列である前記第(3)項記載の遺伝子断片。

-Ala-His-Gln-Pro-Ser-

(5) 該定常領域ポリペプチドが下記のアミノ酸配  
列である前記第(1)項記載の遺伝子断片。

-Ser-Thr-Thr-Ala-Pro-Ser-Val-Phe-Pro-Leu-Asp  
 -Pro-Ser-Cys-Gly-Ser-Thr-Ser-Gly-Ser-Thr-Val  
 -Ala-Leu-Ala-Cys-Leu-Val-Ser-Gly-Tyr-Phe-Pro  
 -Glu-Pro-Val-Thr-Val-Ser-Trp-Asn-Ser-Gly-Ser  
 -Leu-Thr-Ser-Gly-Val-His-Thr-Phe-Pro-Ser-Asp  
 -Leu-Gln-Ser-Ser-Gly-Leu-Tyr-Ser-Leu-Ser-Ser  
 -Met-Val-Thr-Val-Pro-Ser-Ser-Arg-Trp-Ser-Ser  
 -Glu-Thr-Phe-Thr-Cys-Asn-Val-Ala-His-Pro-Ala  
 -Ser-Lys-Thr-Lys-Val-Asp-Lys-Pro-Val-Pro-Lys  
 -Arg-Glu-Asn-Gly-Arg-Val-Pro-Arg-Pro-Pro-Asp  
 -Cys-Pro-Lys-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Met-Leu-Gly  
 -Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Ile-Phe-Pro-Pro-Lys-Pro  
 -Lys-Asp-Thr-Leu-Leu-Ile-Ala-Arg-Thr-Pro-Glu  
 -Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Leu-Gly-Pro-Glu  
 -Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Ile-Ser-Trp-Phe-Val-Asp  
 -Gly-Lys-Gln-Met-Gln-Thr-Ala-Lys-Thr-Gln-Pro  
 -Arg-Glu-Glu-Gln-Phe-Asn-Gly-Thr-Tyr-Arg-Val

-Val-Ser-Val-Leu-Pro-Ile-Gly-His-Gln-Asp-Trp  
 -Leu-Lys-Gly-Lys-Gln-Phe-Thr-Cys-Lys-Val-Asn  
 -Asn-Lys-Ala-Leu-Pro-Ser-Pro-Ile-Gln-Arg-Thr  
 -Ile-Ser-Lys-Ala-Arg-Gly-Gln-Ala-His-Gln-Pro  
 -Ser-Val-Tyr-Val-Leu-Pro-Pro-Ser-Arg-Gln-Gln  
 -Leu-Ser-Lys-Asn-Thr-Val-Ser-Leu-Thr-Cys-Leu  
 -Ile-Lys-Asp-Phe-Phe-Pro-Pro-Asp-Ile-Asp-Val  
 -Gln-Trp-Gln-Ser-Asn-Gly-Gln-Gln-Gln-Pro-Gln  
 -Ser-Lys-Tyr-Arg-Thr-Thr-Pro-Pro-Gln-Leu-Asp  
 -Gln-Asp-Gly-Ser-Tyr-Phe-Leu-Tyr-Ser-Lys-Leu  
 -Ser-Val-Asp-Lys-Ser-Arg-Trp-Gln-Arg-Gly-Asp  
 -Thr-Phe-Ile-Cys-Ala-Val-Het-His-Gln-Ala-Leu  
 -His-Asn-His-Tyr-Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-His  
 -Ser-Pro-Gly-Lys

(6) 前記第(1)項から第(6)項のいずれかに記載のイヌ免疫グロブリンA鎖の定常領域をコードする遺伝子断片をマウス免疫グロブリンH鎖の可変領域をコードする遺伝子断片の3'側に接合したことを特徴とするマウス×イヌキメラ抗体H鎖をコードする遺伝子断片とDNA分子。

しう一方では、医学、農学、畜産学、獣医学から心理学にいたる実験動物としての貢献度は従来から大きなものであったが、近年では医薬品の効果検証や安全性試験にSPFイヌなどの呼称のもとで更に貢献度が高まっている。いずれの場合にも当然の事として、これらのイヌの疾病、特に伝染病に関するより確実な知識がますます必要となり、その診断、治療、予防のための方法が確立される事が要求されている。

イヌのウイルス性疾患は多く、なかでもイヌジステンパーウイルス、イヌパルボウイルス、イヌ伝染性肝炎ウイルス等の疾患は急性で致死率が高い。予防としてのワクチンは開発されているものの、感染・発症したイヌの治療法としては、抗生物質、サルファ剤等の二次細菌感染予防の対症療法しかないこと等、現在の治療法には問題を残している。従来より治療法として高免疫血清や血清由来の免疫グロブリンが使用され有効な実績を残してきた。しかし、現在では、動物愛護思想の高まりと共に、イヌ血清原料の入手が困難になり

(7) 前記第(6)項記載の遺伝子断片とDNA分子を発見ベクターに組み込み、この遺伝子断片とベクターによって形質転換された細胞を増殖し、発見されたマウス×イヌキメラ抗体H鎖を回収することを特徴とするマウス×イヌキメラ抗体H鎖の製造。

(8) 前記第(7)項記載のマウス×イヌキメラ抗体H鎖の製造により得られるマウス×イヌキメラ抗体。

3. 発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は、イヌの疾病、特に伝染病の診断、治療及び予防に期待できる新規なイヌモノクローナル抗体に関する。さらに詳細にはイヌモノクローナル抗体を組成するイヌ免疫グロブリンA鎖の定常領域をコードする遺伝子断片およびこれを利用したマウス×イヌキメラ抗体に関する。

#### 発明の背景

イヌはペットとして昔から人間に愛着のある動物であるが、近年の欧米では、「伴侶、仲間、娯楽としての動物」(Companion species)と称され、人間社会の一員としての地位を獲得しつつある。

この治療法は使いたくとも使用できない状況になっている。従って、従来の高免疫血清に代わって感染ウイルスを中和できるモノクローナル抗体が出来れば、これらウイルス性疾患の治療に大きく貢献することが可能である。

#### 従来の技術

上記のような高免疫血清の代替品として、ウイルス中和活性を有するモノクローナル抗体の使用が考えられる。モノクローナル抗体作製に関する基本的な技術は、これまでに主としてマウス型モノクローナル抗体において確立されている。ハイブリドーマ等の細胞が産生するモノクローナル抗体は大量にしかも平永に得られ、原料不足の問題を解消できうる。しかし、ここにおけるモノクローナル抗体は、副作用(マウスモノクローナル抗体をイヌに使用した場合、異種タンパクとしてアナフィラキシーショックや血清病などの副作用を起こすことが考えられる)をなくす意味から、従来のマウスモノクローナル抗体ではなくイヌモノクローナル抗体でなければならない。

これらのイヌウイルス性疾患の治療薬としてのイヌモノクローナル抗体の作製法には次のようなものが考えられる。(1)イヌ×イヌハイブリドーマを用いる方法。(2)ある種のウイルス及び化学薬剤等でトランスフォームさせたイヌリンパ球を用いる方法。(3)イヌ×マウスヘテロハイブリドーマを用いる方法。(4)イヌ×マウスヘテロハイブリドーマを親株としたイヌ×(イヌ×マウス)ハイブリドーマを用いる方法。(5)キメラモノクローナル抗体(抗原と結合する可変(V)領域はウイルス中和活性を有するマウスモノクローナル抗体から、抗原性あるいは免疫原性及び生理活性に同等する定常(C)領域はイヌモノクローナル抗体からなる、マウス(V)-イヌ(C)キメラモノクローナル抗体)を遺伝子融合して作製する方法。等であるが、これらの方法による成功例は一切報告されていない。

ここで、(1)については融合効率が低いことや適当なミエローマ細胞がないこと、(2)についてはヒトの場合のEBウイルスに相当する適当なウイルスや適当な化学薬剤がないこと、さらに、(3)(4)の

方法ではヒト型モノクローナル抗体作製例から考えて、目的のイヌ型モノクローナル抗体を高効率に得るまでには多くの困難が予想される(例えば、安定性の問題等)。従って、(5)のキメラモノクローナル抗体法がより実現性の高い方法であると考えられる。

このキメラモノクローナル抗体は、可変(V)領域の原料となるマウスモノクローナル抗体を産生するマウス×マウスハイブリドーマからクローニングしたそのV遺伝子と、定常(C)領域の原料となるイヌモノクローナル抗体を産生するイヌ抗体産生細胞からクローニングしたC遺伝子とを結合させたマウス(V)-イヌ(C)キメラ抗体遺伝子を含むプラスミドベクターを、動物細胞(例えば、マウスミエローマ)宿主中で発現させ、その培養上清中に得られるものである。ヒトにおいてはすでにキメラ抗体に関するいくつかの報告が見受けられる(特開昭60-155132号、特開昭61-47590号)。

このようにイヌキメラ抗体の作製には、目的の抗原と結合能を持つ抗体分子の可変(V)領域のアミ

ノ酸配列をコードする遺伝子とイヌ免疫グロブリンの定常(C)領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子が必要となる。キメラ抗体の可変(V)領域遺伝子は、前述した種々のイヌウイルス等に対して中和活性を有するマウスモノクローナル抗体を産生する細胞から得られるもので、この細胞は従来のマウス×マウスハイブリドーマ法で比較的容易に作製することが出来る。しかしながら、キメラ抗体の定常領域遺伝子となるイヌ免疫グロブリンC領域遺伝子については現在のところ全くその構造が知られておらず、遺伝子もクローニングされていない。従って、イヌキメラ抗体を作製するためには、イヌ免疫グロブリンの定常(C)領域のアミノ酸配列をコードする遺伝子を見いだすことが非常に重要な要項となっている。

#### 発明の目的

このような状況にあって、本発明者らは、イヌ免疫グロブリンの定常領域のアミノ酸配列をコードしている遺伝子を単離すべく研究を重ねた結果、これを単離することに成功した。すなわち、本発

明は、これまでに一切報告されていないイヌ免疫グロブリン鎖の定常領域をコードする遺伝子を提供するものであり、これによりイヌキメラ抗体の作製を可能にするものである。本発明のイヌ免疫グロブリン鎖をコードする遺伝子を用いて作られたイヌキメラ抗体は、イヌの疫病、特に伝染病に対して副作用のない診断薬、治療薬、予防薬への応用を可能にするものである。

#### 発明の構成及び効果

免疫グロブリンのγ鎖としては、すでにヒト及びマウス[例えば、A. Shiohara, Cell, 29, p121 (1982); E. Takahashiら, Cell, 29, p671 (1982)]で見えられ、さらに、他の動物種のγ鎖では、ワサザ[C. L. Hartenauら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, p6018 (1982)]、ウシ[E. L. Knightら, J. Immunol., 140, p3654 (1988)]等が報告されているが、イヌ免疫グロブリン鎖に関する報告はまだない。

本発明者らは、イヌ肝臓細胞の染色体DNAから、ヒト免疫グロブリン遺伝子をプローブとして用い、

イヌ免疫グロブリン定常領域をコードすると思われる遺伝子断片を得ることに成功した。クローニングされた遺伝子断片の塩基配列から予測されるアミノ酸配列と、他の動物種の免疫グロブリンのC領域遺伝子の配列とを比較し遺伝子解析を行った結果、本発明により得られた遺伝子断片は、 $\gamma$ 属に属する免疫グロブリン定常領域をコードする遺伝子断片であることが判明した。

得られたイヌ免疫グロブリン $\gamma$ 属定常領域をコードするDNA断片の塩基配列を解析し、該定常領域のアミノ酸配列を見だし、これをこれまでに報告されているヒト、マウス、ウサギ等の免疫グロブリン $\gamma$ 属定常領域のアミノ酸配列と比較検討したところ、イヌ免疫グロブリン $\gamma$ 属定常領域に特徴的なアミノ酸配列として、該 $\gamma$ 属定常領域のC3ドメインのC末端部から最初のシステインの近傍のアミノ酸配列が下記(A)のアミノ酸配列であることが見いだされた。

(A) -Ile-Cys-Ala-

本発明者らは、本発明により解析されたイヌの

域のアミノ酸配列は下記の通りであり、このアミノ酸配列(B)'がイヌ免疫グロブリン $\gamma$ 属定常領域に存在する特有のアミノ酸配列の好ましい一例として挙げられる。

(B) -Ala-His-Gln-Pro-Ser-

本発明のイヌ免疫グロブリン $\gamma$ 属定常領域をコードする遺伝子断片においても、上記(A)および(B)のアミノ酸配列をコードするDNA配列をその一部に有することを特徴とする。このような上記の $\gamma$ 属に含まれるアミノ酸配列は、イヌ免疫グロブリン $\gamma$ 属のC領域を決定する重要なアミノ酸配列と考えられ、本発明により初めて明らかにされた。

これらのアミノ酸配列を含んだイヌ免疫グロブリン $\gamma$ 属定常の好ましい一例を示すと、下記に示すアミノ酸配列が挙げられる。

SerThrThrAlaProSerValPheProLeuAspProSerCys  
GlySerThrSerGlySerThrValAlaLeuAlaCysLeuVal  
SerGlyTyrPheProGluProValThrValSerTryAsaSer  
GlySerLeuThrSerGlyValHisThrPheProSerAspLeu  
GlnSerSerGlyLeuTyrSerLeuSerSerMetValThrVal

免疫グロブリン $\gamma$ 属定常領域のアミノ酸配列、およびこれまでに解析されている種々の動物の免疫グロブリン $\gamma$ 属定常領域のアミノ酸配列と比較することにより、上記のシステインの近傍に存在する-Ile-Cys-Ala-の領域は、イヌ、マウス、ヒト等の種の違いによっていずれも異なるアミノ酸配列となっている領域であることを見いだした。また、同時にこの領域は、例えばヒトの $\gamma$ 属定常領域のアミノ酸配列としては、サブクラス間で極めてよく保存されていることも見だし、今回本発明により明らかにされた上記の配列は、イヌ免疫グロブリン $\gamma$ 属定常領域特有の配列であると推察された。

また、C3ドメインのN末端部から3番目のアミノ酸から始まる配列にも、同様なイヌ免疫グロブリン $\gamma$ 属定常領域特有の下記(B)の配列を見いだした。

(B)-Ala-His-Gln-XXX-Ser-

(XXXは任意のアミノ酸)

尚、本発明においてクローニングされたこの箇

ProSerSerArgTrpSerSerGluThrPheThrCysAsnVal  
AlaHisProAlaSerLysThrLysValAspLysProValPro  
LysArgGluAsnGlyArgValProArgProProAspCysPro  
LysCysProAlaProGlnMetLeuGlyGlyProSerValPhe  
IlePheProProLysProLysAspThrLeuLeuIleAlaArg  
ThrProGluValThrCysValValValAspLeuGlyProGlu  
AspProGluValGlnIleSerTrpPheValAspGlyLysGln  
MetGlnThrAlaLysThrGlnProArgGluGlnGlnPheAsn  
GlyThrTyrArgValValSerValLeuProIleGlyHisGln  
AspTrpLeuLysGlyLysGlnPheThrCysLysValAsnAsn  
LysAlaLeuProSerProIleGlnArgThrIleSerLysAla  
ArgGlyGlnAlaHisGlnProSerValTyrValLeuProPro  
SerArgGluGluLeuSerLysAsnThrValSerLeuThrCys  
LeuIleLysAspPhePheProProAspIleAspValGluTrp  
GlnSerAsnGlyGlnGlnGlnProGluSerLysTyrArgThr  
ThrProProGlnLeuAspGluAspGlySerTyrPheLeuTyr  
SerLysLeuSerValAspLysSerArgTrpGlnArgGlyAsp  
ThrPheIleCysAlaValMetHisGlnAlaLeuHisAsnHis  
TyrThrGlnLysSerLeuSerHisSerProGlyLys

このようなアミノ酸配列もしくはこれをコード

する核酸塩基配列については一切その趣旨同はなく、本発明により初めて開示されるものである。

また、本発明のイヌ免疫グロブリン $\gamma$ 鎖のC領域をコードする遺伝子の具体的核酸塩基配列の一例としては、第5図に示された塩基配列が挙げられる。

また、本発明の $\gamma$ 鎖遺伝子を用いてイヌ染色体BBAとサザンハイブリダイゼーションを行った結果、本発明の $\gamma$ 鎖以外に、同じイヌ $\gamma$ 鎖に属している他のサブクラスのC領域遺伝子がいくつか存在していることが示された。ヒトとマウスの例(例えば、清水ら、Cell, 29, p121 (1982); 高橋ら、Cell, 29, p671 (1982))からも、イヌ $\gamma$ 鎖にもいくつかのサブクラスが存在すると思われる。また、イヌ $\gamma$ 鎖には血清学的に少なくとも4つのサブクラスがあることが知られており(John S. Johansson, J. Immunol, 98, p923 (1966))。本発明の遺伝子はこれら4つのサブクラスの内のいずれかをコードしていると思われる。従って、本発明の遺伝子を用いて残りのサブクラスのC領域遺伝子をクローニングすることが可能であると思われる。

と結合させた場合、マウスV領域遺伝子には発現に必要なプロモーターやエンハンサー等の発現調節領域を含んでいることが好ましい。ただし、プロモーターやエンハンサー等はマウス由来である必要はなく、イヌ由来でもヒト由来でもウイルス由来でも差しつかえない。また、プロモーターはV領域の5'上流域に位置し、エンハンサーはV領域遺伝子とC領域遺伝子の間に位置するのが好ましいが、エンハンサーについては必ずしもこの位置に限定されるものではない。一方、マウスcBBAから単離したV領域遺伝子を、イヌcBBAから単離したC領域遺伝子と結合させる場合、その結合部分は適当な制限酵素サイトや、必要であれば適当な合成リンカーを用いて、V領域遺伝子のコードしているアミノ酸配列とC領域遺伝子のコードしているアミノ酸配列がずれないように、またV領域アミノ酸配列とC領域アミノ酸配列が変化するよう結合しなければならない。さらに、動物細胞中で発現を可能にするための適当なプロモーターやエンハンサー等の発現調節領域を遺伝子の5'上流域に付加してや

両、同一のサブクラス内においても1ヶ所から数カ所のアミノ酸が置換されているアロタイプの異なる遺伝子が存在することがヒト、ウサギ等の免疫グロブリン $\gamma$ 鎖の遺伝子解析の結果からも予想される。本発明のイヌ免疫グロブリン $\gamma$ 鎖塩基配列をコードする遺伝子断片は、上記のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片のみに限られず、このような部分的にアミノ酸が置換されているアロタイプの異なる遺伝子をも包含する。キメラ抗体の作製方法はすでにマウス-ヒトキメラ抗体で示された方法(渡辺ら、Cancer Research, 47, p999-1005 (1987))に準じて行うことが出来る。すなわち、キメラ抗体遺伝子は、基本的にV領域遺伝子とC領域遺伝子の2断片の遺伝子断片を結合させることにより構築される。さらに、遺伝子の単離法に応じて、主として2つの結合の組合せがある。すなわち、染色体BBAから単離したVとC領域遺伝子、cBBAから単離したVとC領域遺伝子の組合せである。例えば、マウス染色体BBAから単離したV領域遺伝子を、イヌ染色体BBAから単離したC領域遺伝子

と必要がある。このようにして作製したキメラ抗体遺伝子を、例えば、pSV2-gpt(B. C. Holliganら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, p2027 (1981))、pSV2-neo(P. J. Southernら、J. Mol. Appl. Genet., 1, p327 (1982))等の選択マーカーの付いた適当なベクタープラスミドに、あるいは、宿主細胞内でプラスミド状態で増殖できるウイルス遺伝子の一部(パピローマウイルスなど)を持ったベクタープラスミドに、V領域遺伝子とC領域遺伝子を別々に、あるいは同時に組み込み、キメラ抗体遺伝子プラスミドを構築することが好ましい。マウス-イヌキメラ抗体を得るためには、このようにして調製されたキメラ抗体遺伝子を含むプラスミドを用いて宿主動物細胞を形質転換することが必要である。宿主動物細胞としては、不死化されたマウス及び他の動物細胞、好ましくはBリンガ系細胞(例えば、P3X63Ag8-653(ATCC CRL 1580)、P3X63Ag80-1(ATCC CRL 1597)、P3/H51/1 Ag4-1(ATCC CRL18)、Sp2/0-Ag12(ATCC CRL 1581)等の形質細胞、ハイブリドーマ)である。BBAによる

細胞の形質転換方法としては、BAL-デキストラン法、細胞カルシウム共沈降法、プロトプラスト融合法、エレクトロポレーション法等の方法[例えば、B. D. Barnesら編纂「Transcription and Translation」BL Press (1984)参照]があり、いずれの方法でもよい。I型とII型のキメラ抗体遺伝子を同時に持つプラスミドで形質転換を行う場合には選択マーカーはI型でよいが、I型I型別々の場合にはI型型のマーカーが必要である。この場合には、1つのプラスミドで形質転換を行った後に、さらにもう一方のプラスミドで形質転換を行う二重形質転換法を用いるのが好ましい。このようにして形質転換された細胞を通常のハイブリドーマと同じような条件下[例えば、10%牛胎児血清を含むF12(1640増地中)で培養すれば、この細胞から通常のハイブリドーマの発生する抗体と同様にマウス-イヌキメラ抗体が分泌産生される。このキメラ抗体は通常の抗体と同様な方法により精製することが出来る。

本発明により提供されるイヌ免疫グロブリンを

コードする遺伝子断片は、イヌ免疫グロブリンA鎖のC領域の特異的アミノ酸配列もしくはBFA配列を調示するものであり、この遺伝子を用いて、上述のようにして得られるマウス-イヌキメラ抗体は、イヌの抗体に対して、これまでになかった実質的に有効な抗原、予防及び治療剤となりうるものである。

次に、その実施例を示すが本発明はこれに限定されるものではない。

#### 実施例

##### (1)イヌ抗体遺伝子の発見

イヌA鎖遺伝子をクロスハイブリダイゼーション法によりクローニングするために、まずヒトA鎖[工藤ら、Cancer, 33, p181 (1985)、西村ら、Cancer Res., 47, p999 (1987)]とのクロスハイブリダイゼーションの条件を検討した。コンピュータを用いてマウス、ヒト、ウサギA鎖間でホモロジー解析をした結果、特にC82-C83エクソンを含む領域が非常にホモロジーが高いことが示された。従って、このヒトC $\alpha$ 遺伝子よりC82-C83エクソン

を含むPstI-SphI断片を切り出し、プローブとして使用した。

イヌ肝臓の染色体DNA100 $\mu$ をNhoIで部分消化(10units, 37 $^{\circ}$ C, 10分)した後、この18~20kbに相当するDNA断片をシロリ糖変性勾配濾心[シロリ糖10~40%, (vol/vol), 26000rpm, 18時間, 15 $^{\circ}$ C]により調製した。次にこのDNA断片とλEMBL3ベクター-DNA(ストラタジーン社製)のBamHI切断DNAとをT4DNAリガーゼにより連結させ、ストラタジーン社のキットを用いて、in vitroパッケージングを行い、p2192大腸菌(ストラタジーン)に感染させ、イヌ肝臓細胞のA鎖遺伝子ライブラリを得た。このライブラリから、ヒトC $\alpha$ アローブを用いてブランクハイブリダイゼーション[B. D. Beaton, B. W. Davis, Science, 196, p180 (1977)]を行い、イヌC $\alpha$ 鎖エクソンを含むクローンpH0DE9aを選択した。このクローンのサイズは約20kbで、その制限酵素切断点地図を図1図に示す。このクローンから、イヌC $\alpha$ エクソンを含むBamHI-BamHI断片DE94 $\alpha$  (2kbp)を分離し後の実験に用いた。

##### (2)DE94 $\alpha$ を用いたサザン及びノーザンブロット分析

初めにこのDE94 $\alpha$ を用いたサザンブロット分析を行った。イヌ肝臓細胞の染色体DNA100 $\mu$ を制限酵素BamHIで切断し、このDNAを電気泳動で0.7%アガロースゲルに調製し、ナイロンメンブレンフィルター(ハイボンド-Bプラス、アマシム社製)に転写後、イヌC $\alpha$ 鎖領域を含んだ<sup>32</sup>P標識DE94 $\alpha$ アローブとサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの方法はハイボンド-Bプラスに付属していたマニュアルのプロトコールに従った。検出されたバンドのパターンを、ヒトC $\alpha$ 鎖アローブを用いたクロスハイブリダイゼーションのパターンと比較した結果、全く同じ位置(2kb)にバンドがみとめられた(図2図)。分子サイズはλファージDNAをHindIIIで切断したマーカーDNAによって算出した。また、2kbp以外に1.9, 1.2, 1.05kbpにもDE94 $\alpha$ とハイブリダイズするバンドを検出した。この結果より、このDE94 $\alpha$ 以外に同じイヌA鎖に属している他のサブクラスのC $\alpha$ 鎖

遺伝子がいくつか存在していることが示された。イヌゲ属には血清学的に少なくとも4つのサブクラスがあることが知られており [John S. Johnsonら, J. Immunol., 98, p923 (1966)], DE947遺伝子はこれら4つのサブクラスの内のいずれかをコードしていると思われる。

次にノーザンブロット分析を行った。イヌゲ属ポリA+DNA (クローンテック社製) 2 $\mu$ gを電気泳動により3%ホルムアルデヒドを含む0.75%アガロースゲルに固定し、ナイロンメンブレンフィルター (ハイボンD-3プラス) に転写後、<sup>32</sup>P]標識DE947プローブとノーザンハイブリダイゼーションを行った。ノーザンハイブリダイゼーションの方法はハイボンD-3プラスに付属のマニュアルのプロトコルに従った。このプローブにより約1.8kbの位置にバンドが検出された (第3図)。このサイズはマウス及びヒトで知られている免疫グロブリン $\gamma$ 遺伝子のサイズとはほぼ同じである。

これら2つの結果より、DE947は遺伝的なイヌゲ領域を含む活性な遺伝子であることが推定され

るイヌゲ遺伝子が確認された。第5図にその結果を示す。さらに、この核酸塩基配列を基に予想されるアミノ酸に実施した (第6図)。

このDE947の核酸配列を基に遺伝子解析ソフト (Genetyx: ソフトウェア開発社製) を用いて、LASLデータベースをホモロジー検索したところ、ヒト及びマウスの免疫グロブリン $\gamma$ と高いホモロジーを示し、免疫グロブリン $\gamma$ 遺伝子以外の遺伝子とはホモロジーは示さなかった。DE947遺伝子のC $\gamma$ 領域とマウス及びヒトのC $\gamma$ 領域をホモロジー比較すると、アミノ酸レベルでマウス $\gamma$ 1とは61.0%、ヒト $\gamma$ 1とは70.4%であった。

以上の結果より、DE947遺伝子は間違いなくイヌゲ属に属する遺伝子であり、マウス-イヌゲ $\gamma$ 抗体の作製を可能にする遺伝子であると思われる。

#### (4) マウス免疫グロブリン $\gamma$ 遺伝子 (V $\gamma$ ) 領域遺伝子の単離

抗CPV抗体産生ハイブリドーマJP2 (71.4) より染色体DNAを単離し、染色体DNA 100 $\mu$ gを制

た。尚、このDE947が組み込まれたプラスミドを有する大腸菌は、Escherichia coli DCG-DE94G [農工研菌第11466号] として出願人により寄託されている。

#### (3) DE947の核酸塩基配列とアミノ酸配列

イヌゲ領域の核酸塩基配列を調べるために、クローンDE947から、BamHI-EcoRI, EcoRI-HinfI, HinfI-HinfI, HinfI-HinfI, HinfI-BamHIの各小DNA断片を調製した。これらの各小断片をT4-DNAポリメラーゼを用いて切断端を平滑末端に変えた後、H13ap19ベクターのSmaIサイトにライゲーションキットを用いて挿入した。東洋紡インストラクショナルマニュアルの方法に従い、JM109のコンピテント細胞を調製し、C $\gamma$ 領域遺伝子を挿入したH13ap19 DNAで形質転換させ、一本鎖DNAを抽出精製した。さらにこの一本鎖DNAの核酸塩基配列決定は、Sequenase ver. 2.0 DNAシーケンスキット (United States Biochemical Corporation) を用いて行った。核酸塩基配列を行った方向は第4図に示す。核酸塩基配列決定の結果、CH1-ヒンジ-CH2-CH3からな

る領域をHindIIIで切断する。次にこのDNA断片と $\lambda$  L47ベクターDNA (ストラタジェン) をT4 DNAリガーゼにより連結させ、JP2細胞の染色体DNAライブラリを得た。このライブラリから、ブランクハイブリダイゼーション法 [W. D. Beatty, R. V. Davis, Science, 190, (p180 (1977) 参照)] によりマウスJHプローブを用いて抗CPV抗体のVH領域遺伝子を含むクローンJP2aH211を選別した。第7図はその制限酵素切断点地図である。この遺伝子断片よりVHエクソン部分を含んだEcoRI-SacI断片を調製し、以下のイヌゲマウス $\gamma$ 抗体H領域遺伝子の材料とした。尚、この抗イヌゲポウウイルス活性を有するマウス免疫グロブリンH領域のV領域遺伝子が組み込まれたプラスミドを有する大腸菌が、Escherichia coli MYE-JP2 [農工研菌第11167号] として出願人により寄託されている。尚、同じJP2細胞から、マウスJ $\gamma$ プローブを用いてクローニングした抗イヌゲポウウイルスマウス免疫グロブリン $\gamma$ 領域のV領域遺伝子は、Escherichia coli MYE-JP2 [農工研菌第



第11165号]として出願人により寄託されている。

(5) マウス-イヌキメラ抗体H鎖遺伝子(pSV2-PH2C $\gamma$ )の作成

(1)で得られたプラスミドpDE94 $\gamma$ をBamHIで切断し、イヌ免疫グロブリンC $\gamma$ 鎖遺伝子を含む2kbのBamHI断片を調製した。この遺伝子をBamHIで切断したpSV2-gptベクターとともにライゲーションキットを用いて連結し、プラスミドpSV2-BC $\gamma$ を得た。次に、(4)で得られたpJP2gH211のEcoRI-SacI断片の両端をT4-DNAポリメラーゼを用いて平滑末端に覚え、ライゲーションキットを用いて前述のプラスミドpSV2-BC $\gamma$ のBpaIサイトに挿入しプラスミドpSV2-PHBC $\gamma$ を作製した。(第8図)

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明においてクローニングされたイヌ免疫グロブリン $\gamma$ 鎖定常領域をコードする染色体DNA断片(BHobE9a及びDE94 $\gamma$ )の制限酵素切断地図を示す。

第2図は、イヌ肝臓細胞の染色体DNAを制限酵素BamHIで切断し、これをイヌC $\gamma$ 鎖領域を含んだ

11P]鎖DE94 $\gamma$ (1)及び[11P]鎖HトC $\gamma$ 1鎖(2)アローブとサザンハイブリダイゼーションを行った結果の模式図である。

第3図は、イヌ脾臓ポリA<sup>+</sup>BNAと[11P]鎖DE94 $\gamma$ アローブとのノーザンハイブリダイゼーションの模式図である。

第4図は、本発明でクローニングされたDNA断片DE94 $\gamma$ の制限酵素切断地図および塩基配列解析を行った領域(一)を示す。

第5図は、本発明でクローニングされたDNA断片DE94 $\gamma$ に存在するイヌ免疫グロブリン $\gamma$ 鎖定常領域をコードするDNA塩基配列を示す。

第6図は、本発明でクローニングされたDNA断片DE94 $\gamma$ 中にコードされるイヌ免疫グロブリン $\gamma$ 鎖定常領域の全アミノ酸配列を示す。

第7図は、実施例(5)で調製した抗CPV抗体のVH鎖遺伝子を含むクローンJP2gH211の制限酵素切断点地図を示す。

第8図は、実施例(6)で調製した抗CPVマウス $\times$ イヌキメラ抗体H鎖を発現する遺伝子(pSV2-PHBC

$\gamma$ )の制限地図を示す。

特許出願人 財団法人 化学及血清療法研究所

代理人 井理士 岡井 知

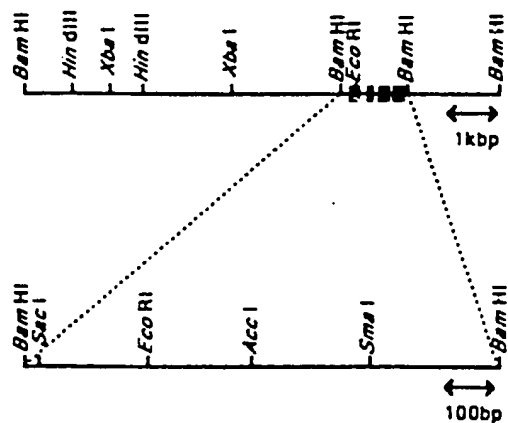
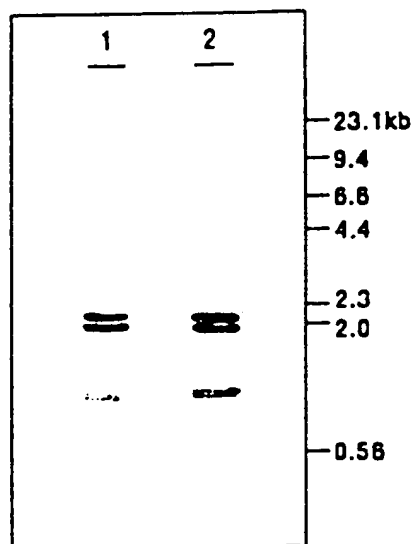
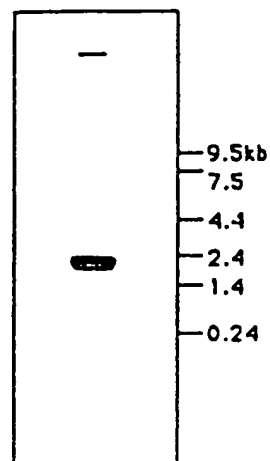


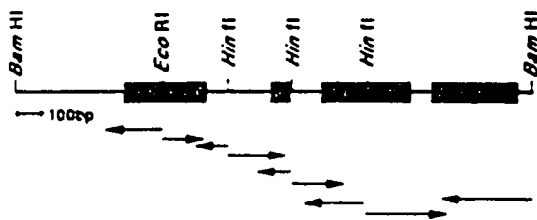
図1



第 2 図



第 3 図



第 4 図

第 5 図

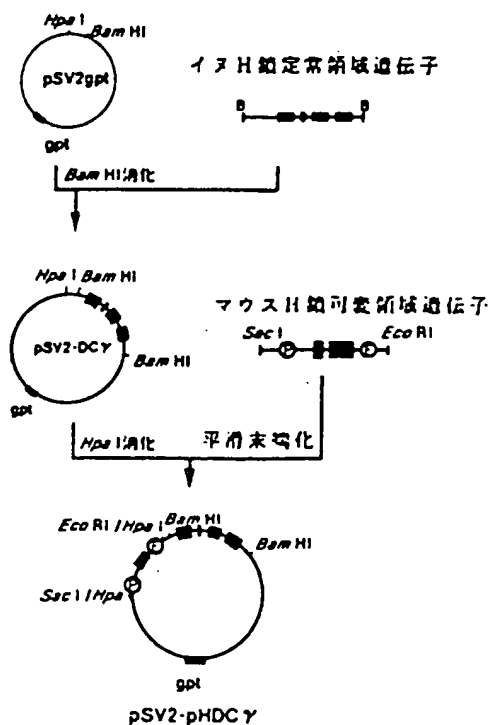
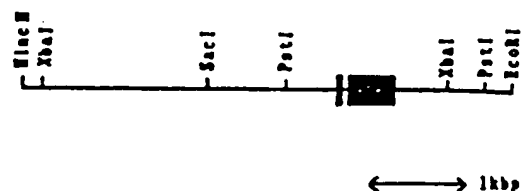
```

CCTCCACGAC GGGCCCTCG GTTTTCAC TGGAGCCAG CTGCGGCTCC
ACTTCCGGCT CCACGGTGGC CCGGCTCG CTGGTGTGAG GCTACTTCCG
CGAGCCTGTA ACTGTGTCTT GGAATTCGG CTCTTTGACC AGCGGTGTGT
ACACCTTCCC GTCCGACCTG CAGTCCTCAG GGTCTATCT CCTCAGGAGC
ATGGTGACAG TGGCTCCAG CAGGTGGTCC AGCGAGACCT TCACCTGCAA
CGTGGCCGAC CCGCCGAGCA AAAGTAAAGT AGACAAGCCA GTGCCCAAAA
GAGAAAAATG AAGAGTTCTT GGGCCACCTG ATTGTCCCAA ATGCCCACTC
CCTGAAATGC TGGGAGGGCC TTGGGTCTTC ATCTTTCCCC CGAAACCCAA
GGACACCCTC TTGATTGCCC GAACACCTGA GGTACATGT GTGGTGGTGG
ATCTGGGACC AGAAGACCTT GAGGTGCAGA TCAGGTGGTT CGTGGACGGT
AAGCAGATGC AAACAGCCAA GACTCAGCCT CGTGAGGAGC AGTTCAATGG
CACCTACCGT GTGGTCAGTG TCGTCCCAT TGGGACCCAG GACTGGCTCA
AGGGGAAGCA GTTCACTGC AAAGTCAACA ACAAGCCCT CCCATCCCGG
ATCGAGAGGA CCATCTCAA GCCCAGAGGG CAGGCTCATC AGCCCACTGT
GTATGTCTG CCGCATCCC GGGAGAGTT GAGCAAGAA ACAGTCACTT
TGACATGCT GATCAAAGAC TTCTTCCCAC CTGACATTGA TGTGGAGTGG
CAGAGCAATG GACAGCAUGA GCGTGAGAG AAGTACCGCA CGACCCCGCC
CCAGCTGGAC GAGGACGGGT CCTACTTCT GTACAGCAAG CTCTCTGTGG
ACAAGAGCCG CTGGCAGCGG GGAGACACCT TCATATGTGC GGTGATGCAT
GAAGCTCTAC ACAACCACTA CACACAGAAA TCCCTCTCCC ATTCTCCGGG
TAAATGA
    
```

第 6 図

Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Asp Pro Ser Cys  
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val  
 Ser Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 Gly Ser Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ser Asp Leu  
 Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Met Val Thr Val  
 Pro Ser Ser Arg Trp Ser Ser Glu Thr Phe Thr Cys Asn Val  
 Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys Pro Val Pro  
 Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro  
 Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Gly Pro Glu  
 Asp Pro Glu Val Glu Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Glu  
 Met Glu Thr Ala Lys Thr Glu Pro Arg Glu Glu Glu Phe Asn  
 Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His Glu  
 Asp Trp Leu Lys Gly Lys Glu Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn  
 Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala  
 Arg Gly Glu Ala His Glu Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro  
 Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys  
 Leu Ile Lys Asp Phe Phe Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp  
 Glu Ser Asn Gly Glu Glu Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr  
 Thr Pro Pro Glu Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr  
 Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Glu Arg Gly Asp  
 Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 Tyr Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys ...

第 7 図



第 8 図

第1頁の続き

④Int. Cl. \*

C 12 N 15/62  
C 12 P 21/08  
// A 61 K 39/395  
G 01 N 33/531  
33/577

識別記号

庁内整理番号

A F E	H	8214-4B
	A	8829-4C
	B	7906-2J
		9015-2J